

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Barbora Bočková

Bordetella pertussis a dávivý kašel: Bakterie a její faktory virulence,
epidemiologie onemocnění a prevence očkováním.

Bordetella pertussis and whooping cough: Bacterium and its virulence factors,
epidemiology of disease and vaccination strategy.

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jana Holubová, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 5. 2014

Poděkování:

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Holubové, Ph.D. za cenné rady a vstřícnost v průběhu vypracovávání mé bakalářské práce. Mé poděkování patří též prof. Ing. Petru Šebovi, CSc. za umožnění získat odborné zkušenosti v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů (MBÚ AV ČR, v.v.i.).

Abstrakt:

Bordetella pertussis je gram-negativní bakterie, která je lidským patogenem kolonizujícím horní cesty dýchací. Je původcem onemocnění dávivého kašle, známého také pod názvem černý kašel nebo pertuse. *B. pertussis* produkuje řadu faktorů virulence, které můžeme rozdělit na toxiny a adheziny. Proti infekci *B. pertussis* byly vyvinuty nejprve celobuněčné a následně acelulární vakcíny. V posledních dvaceti letech byl celosvětově zaznamenán nárůst případů onemocnění. Tato práce uvede základní informace o *B. pertussis* a dávivém kašli. Hlavní náplní bude shrnout současnou epidemiologickou situaci, poukázat na důvody zvyšující se incidence a uvést možná řešení současné situace.

Klíčová slova:

Bordetella pertussis, virulence, dávivý kašel, epidemiologie, vakcinace

Abstract:

Bordetella pertussis, a gram-negative bacterium, is a human pathogen which affects the upper respiratory tract. It is the causative agent of whooping cough or pertussis. *B. pertussis* produces several virulence factors consisting of toxins and adhesins. Whole cell vaccine and subsequent acellular vaccine were developed against pertussis in the past. However, a gradual increase of pertussis incidences has been reported in the last twenty years. This thesis provides basic information about *B. pertussis* and whooping cough. The main aim of the herein presented work is to summarize the contemporary epidemiologic situation along with determining reasons for increased pertussis cases. In addition, possible solutions for the present situation are proposed.

Key words:

Bordetella pertussis, virulence, whooping cough, epidemiology, vaccination

Seznam použitých zkratk a jejich vysvětlení

- ACT adenylát cyklázový toxin
- AfuA železem regulovaný protein *B. pertussis*
- AmpG transportér
- aP acelulární pertusová vakcína
- ATP adenosintrifosfát
- BPZE1 celobuněčná živá vakcína
- BrkA autotransportér (z angl. Bordetella resistance to killing)
- Bvg systém regulace virulence (z angl. Bordetella virulence gene)
- cAMP cyklický adenosinmonofosfát
- CDC Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (z angl. Centers for Disease Control and Prevention)
- CpG nemetylovaný cytosin-guaninový dinukleotid s fosfátovou vazbou
- DNT dermonekrotický toxin
- DTaP kombinovaná vakcína obsahující toxoid záškrtu, tetanu a vybrané antigeny *B. pertussis*
- DTP kombinovaná vakcína obsahující toxoid záškrtu, tetanu a usmrcenou *B. pertussis*
- ELISA metoda detekce protilátek (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
- FHA filamentózní hemaglutinin
- FIM fimbrie
- IFN- γ interferon γ
- IgA imunoglobulin A
- IgG imunoglobulin G
- IL interleukin
- IS inzertovaná sekvence (z angl. insertion sequence)
- IRP1-3 železem regulovaný protein *B. pertussis* (z angl. iron regulatory protein)
- LOS lipooligosacharid
- LPS lipopolysacharid

- NLR intracelulární receptor (z angl. NOD-like receptor)
- PCR polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
- PHAC z angl. Public Health Agency of Canada
- PRN pertaktin
- PTX pertusový toxin
- RGD tripeptid aminokyselin arginin, glycin, aspartát
- Rho GTPáza malá signalizační GTPáza
- SZÚ Státní zdravotní ústav
- Tdap kombinovaná vakcína obsahující toxoid tetanu, redukovaný toxoid záškrtu a redukované antigeny *B. pertussis*
- TCT tracheální cytotoxin
- Th1 pomocné T buňky typu 1
- Th2 pomocné T buňky typu 2
- Th17 pomocné T buňky typu 17
- TLR9 membránový receptor (z angl. Toll-like receptor 9)
- TNF- α tumor nekrotizující faktor α (z angl. tumor necrosis factor α)
- WHO Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)
- wP celobunečná pertusová vakcína

Obsah

1	Úvod	1
2	<i>Bordetella pertussis</i>	2
2.1	Faktory virulence	2
2.1.1	Adheziny.....	2
2.1.2	Toxiny.....	3
2.1.3	Bvg systém	4
3	Dávivý kašel	5
3.1	Historie dávivého kašle	5
3.2	Patogeneze	5
3.3	Klinický obraz.....	6
3.4	Diagnostika.....	6
3.4.1	Kultivace.....	7
3.4.2	Polymerázová řetězová reakce	7
3.4.3	Serologické vyšetření	7
3.5	Terapie.....	8
4	Epidemiologie dávivého kašle	9
4.1	Situace v České republice	10
5	Očkování	12
5.1	Historie očkování	12
5.2	Očkování v České republice	13
6	Návrat dávivého kašle	14
6.1	Důvody narůstajícího počtu případů	14
6.1.1	Navození nedostatečné a krátkodobé imunity	14
6.1.2	Nevhodná imunitní odpověď	15
6.1.3	Genetické změny cirkulujících kmenů	16
6.1.3.1	Pertaktin.....	17
6.1.3.2	Pertusový toxin	17
6.1.3.3	Fimbrie	18
6.2	Epidemiologická opatření	19
6.2.1	Očkování matek v průběhu těhotenství.....	19
6.2.2	„Cocoon“ strategie	19
7	Vývoj nových vakcín	21
7.1	Modifikace antigenů současných vakcín	21
7.2	Nová formulace vakcíny	22
7.2.1	Vhodné adjuvans	22
7.2.2	Izolování vezikulů z vnější membrány bakterie	23
7.3	Vývoj nové celobuněčné vakcíny	23
7.3.1	Živý kmen	24
7.3.2	Usmrcený kmen	24
8	Závěr	26
9	Literatura	27

1 Úvod

Bordetella pertussis je lidským patogenem způsobujícím dávivý kašel. Jedná se o akutní onemocnění respiračního traktu. Toto onemocnění představuje výrazné riziko především pro novorozence a malé děti, u kterých může mít fatální následky končící i úmrtím.

S nástupem vakcinace došlo k rapidnímu poklesu případů a hlavně k výraznému snížení počtu úmrtí. V posledních letech byl však zaznamenán nárůst incidence, čímž se téma dávivého kašle stalo opět aktuální a vyžaduje maximální pozornost. Vzhledem k vysokému ohrožení novorozenců a dětí je nutné současnou situaci okamžitě řešit a intenzivně pracovat na potlačení infekce.

Epidemiologické situaci a účinnosti vakcín se v současné době věnuje mnoho vědeckých skupin. Jejich aktuální studie poukazují na několik důvodů, proč není ani vysoké procento proočkovanosti populace dostačující.

Cílem této práce je uvést základní informace týkající se *B. pertussis* a dávivého kašle, popsat současnou epidemiologickou situaci, možnosti prevence a poukázat na možné důvody zvyšujícího se počtu případů. Snahou je zároveň uvést možnosti, které by pomohly situaci vyřešit a dostat dávivý kašel pod kontrolu. Tyto změny se týkají nejenom vývoje nových vakcín, ale i přístupu laické a odborné veřejnosti k současné situaci.

2 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je striktně aerobní gram-negativní nepohyblivá tyčinka ovoidního tvaru, která je lidským patogenem kolonizujícím horní cesty dýchací. Bakterie není schopna přežívat mimo hostitelský organismus a není znám žádný zvířecí rezervoár (CDC, 2012). *B. pertussis* je původcem onemocnění dávivého kašle, známým také jako černý kašel nebo pertuse. Příbuzná a vývojově velmi blízká bakterie *Bordetella parapertussis* způsobuje dávivý kašel s mírnějšími příznaky (Beneš, 2009).

B. pertussis byla pojmenována podle svého objevitele, belgického mikrobiologa Julese Bordeta. Ten ji poprvé identifikoval v roce 1900 v hlenu pacienta s dávivým kašlem. O 6 let později se mu ji podařilo společně s kolegou Octavem Gengou kultivovat na speciálně upraveném médiu (Bordet-Gengou agar) (Bordet, 1906; cit. dle Guiso, 2014).

2.1 Faktory virulence

B. pertussis produkuje celou řadu faktorů virulence, které jsou důležité pro úspěšnou infekci a kolonizaci hostitele. Mnohé z nich mají imunomodulační funkci, což umožňuje bakterii obejít imunitní systém hostitele. Faktory virulence dělíme na toxiny a adheziny. V této práci zmíním pouze ty nejdůležitější.

Mezi faktory virulence zodpovědné za adhezi na cílové buňky řadíme filamentózní hemagglutinin, pertaktin a fimbrie. Mezi toxiny řadíme pertusový toxin, dermonekrotický toxin, tracheální cytotoxin, adenylát cyklázový toxin a lipopolysacharid.

2.1.1 Adheziny

Filamentózní hemagglutinin (FHA) je nejvýznamnější adhezin produkováný *B. pertussis*. Byl pojmenován na základě schopnosti aglutinovat erythrocyty (Arai, 1976; cit. dle Gupta et al., 1990). Struktura FHA obsahuje několik vazebných domén, které umožňují vazbu na epitel respiračního traktu a stejně tak na povrch

makrofágů a monocytů (Ishibashi et al., 1994; Prasad et al., 1993). V poslední době se ukazuje, že FHA má pravděpodobně i imunosupresivní vlastnosti, neboť v monocytech indukuje produkci IL-10, který inhibuje sekreci IFN- γ (Dirix et al., 2009).

Pertaktin (PRN) je protein, který bakterie exprimuje na svém povrchu. Tento protein stejně jako FHA obsahuje RGD (triplet Arg-Gly-Asp) vazebnou doménu, která je důležitá pro adhezi na epitelální buňky respiračního traktu (Leininger et al., 1991). Nedávná studie ukazuje, že pertaktin hraje roli v obraně proti neutrofilům (Inatsuka et al., 2010).

Fimbrie (FIM) jsou filamentární struktury na buněčném povrchu gram-negativních bakterií. *B. pertussis* exprimuje 2 hlavní podjednotky Fim2 a Fim3, na základě nichž se rozlišuje sérotyp (Willems RJ. 1992). Fim2 a Fim3 obsahují domény, které umožňují vazbu na extracelulární matrix epitelálních buněk (Geuijen et al., 1998).

2.1.2 Toxiny

Pertusový toxin (PTX) usnadňuje vazbu na epitelální buňky a způsobuje lymfocytózu (Carbonetti et al., 2003; Morse & Morse, 1976). PTX po translokaci do cílové buňky katalyzuje přenos ADP-ribózy na α podjednotku trimerního G proteinu, čímž způsobí nekontrolovatelný nárůst intracelulárního cAMP a deregulaci signálních drah (Katada et al., 1983). PTX byl pojmenován na základě hypotézy, že je nezbytný pro vznik dávivého kašle (Pittman, 1979; cit. dle Hewlett et al., 2014). Vzhledem k tomu, že *B. paraptussis* tento toxin neprodukuje, a přesto je schopna vyvolat dávivý kašel, bylo od této hypotézy upuštěno.

Dermonekrotický toxin (DNT) není sekretován do extracelulárního prostoru a jeho role ve virulenci není ještě zcela objasněna (Cowell et al., 1979). DNT způsobuje nekrotické léze a aktivuje Rho GTPázy, čímž ovlivňuje například stavbu cytoskeletu a formaci stresových vláken (Masuda et al., 2000).

Tracheální cytotoxin (TCT) je degradační produkt při obnově peptidoglykanu všech gram-negativních bakterií. Je translokován pomocí transmembránového proteinu AmpG do cytozolu bakterie a následně znovu využit pro syntézu buněčné

stěny (Jacobs et al., 1994). U *B. pertussis* není přenašeč AmpG funkční a není tedy schopen translokovat TCT do cytozolu. TCT tak zůstává v extracelulárním prostoru, kde destruuje cilié epitelálních buněk (Goldman et al., 1982; Heiss et al., 1993).

Adenylát cyklázový toxin (ACT) se skládá z vazebné a katalytické domény. Vazebná doména zprostředkovává vazbu na membránu cílových buněk a umožňuje translokaci do cytozolu (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003; Sakamotos et al., 1992). V cytozolu se aktivuje katalytická doména a katalyzuje konverzi ATP na cAMP, čímž dereguluje signální dráhy pro fagocytózu a apoptózu (Basler et al., 2006; Khelef et al., 1993).

Lipopolysacharid (LPS) je lokalizován na vnější membráně *B. pertussis* a skládá se z penta-acetylovaného lipidu A navázaného na oligosacharidové jádro (Caroff et al., 2001). LPS po uvolnění z membrány působí jako endotoxin (Watanabe et al., 1990). LPS *B. pertussis* postrádá oproti ostatním gram-negativním bakteriím O-antigen, jedná se tedy spíše o lipooligosacharid (LOS) (Preston et al., 1999). O-antigen působí jako ochrana proti sérovému komplementu, ale i přesto je *B. pertussis* schopna se komplementu bránit (Pishko & Betting, 2003).

2.1.3 Bvg systém

Exprese mnoha genů *B. pertussis*, včetně některých faktorů virulence, je pod vlivem dvoukomponentového systému Bvg (z angl. Bordetella virulence gene), skládajícího se ze senzorové (BvgS) a efektorové části (BvgA) (Cummings et al., 2006; Weiss et al., 1983). Tento systém umožňuje fázovou změnu. Rozlišujeme fázi virulentní (Bvg⁺), intermediální (Bvgⁱ) a nevirulentní (Bvg⁻). Bvg systém je regulován změnami okolního prostředí, *in vitro* například změnou teploty, pomocí sulfátu nebo nikotinové kyseliny (Melvin et al., 2014).

3 Dávivý kašel

Dávivým kašlem nazýváme onemocnění postihující horní cesty dýchací, jenž je charakterické silnými záchvaty kašle. Jelikož se s nástupem vakcinace začal zvyšovat počet onemocnění u adolescentů a dospělých (viz kapitola 4), ukázala se domněnka lékařů, že se jedná o onemocnění pouze dětské jako chybná. I když právě u dětí je majoritní výskyt.

Infekcí jsou nejvíce ohroženi novorozenci a malé děti, u kterých mohou být následky fatální, končící až smrtí (Paddock et al., 2008). Pro adolescenty a dospělé nečiní pertuse příliš velké zdravotní riziko, přesto je důležité infekci u nich co nejdříve zachytit a léčit. Mohou být totiž zdrojem infekce a tím ohrozit nedostatečně imunizované jedince (Wendelboe et al., 2007). Zvýšenou pozornost vyžadují také imunodeficientní či starší osoby. Pro dospělé osoby onemocnění představuje především ekonomické riziko vzhledem k dlouhotrvajícím příznakům.

3.1 Historie dávivého kašle

Historie dávivého kašle nesahá, narozdíl od většiny běžných infekčních onemocnění, do starověku. První zmínky jsou z roku 1414, kdy výskyt onemocnění popisuje Nils Rosen von Rosenstein (Lapin, 1943; cit. dle Mattoo & Cherry 2005). Poprvé byl dávivý kašel popsán v 16. století Guillaumem de Baillou. Stalo se tak po epidemii v Paříži v roce 1578 (Baillou, 1640; cit. dle Cone, 1970). V roce 1679 Sydenham pojmenoval onemocnění jako pertuse, označující přetrvávající kašel (Mattoo & Cherry 2005). Jak již bylo zmíněno, o první studie patogenu se zasloužil Jules Bordet se svým kolegou Octavem Gengou (viz kapitola 2).

3.2 Patogeneze

B. pertussis se přenáší kapénkovou infekcí (Warfel et al., 2012a). Po vdechnutí bakterie adhezuje na řasinkový epitel nosohltanu a trachey, kde se rychle pomnoží (Paddock et al., 2008). Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, faktory virulence produkované *B. pertussis* usnadňují adhezi a pronikání do epiteliálních buněk, kde některé z nich deregulují signální dráhy. Bakterie dráždí sliznice a vazbou na

řasinky omezuje jejich pohyb a zároveň je ničí, což znesnadňuje vykašlávání hlenu. Bakterie neproniká do krve a hlubokých tkání (Beneš, 2009).

Ke studiu *B. pertussis* jsou využívány různé zvířecí modely, například krysy, myši, prasata a primáti. V současné době se jako nejvhodnější zvířecí model považuje pavián (*Papio anubis*). U těchto paviánů se projevují podobné symptomy jako u lidí. Mají tělesnou teplotu podobnou té lidské, což přispívá k navození srovnatelných podmínek pro bakterii jako v lidském těle (Warfel et al., 2012b).

3.3 Klinický obraz

Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 7-10 dní, ale může trvat i déle (Heininger et al., 1998). Klasický průběh onemocnění dělíme do 3 fází – katarální stádium, paroxysmální stádium a rekonvalescentní stádium. Během katarálního stádia se objevují příznaky připomínající běžné nachlazení, jako je rýma a dráždivý kašel. Dráždivý kašel postupně přechází v záchvaty dávivého kašle, které jsou typické pro paroxysmální stádium a obecně pro pertusi. Záchvaty bývají velmi vyčerpávající, často doprovázeny i zvracením. V průběhu záchvatu kašle může vzhledem k nedostatečnému okysličení docházet k hypoxii a cyanóze. Mezi záchvaty se pacient cítí relativně zdravý. Paroxysmální stádium trvá 2-8 týdnů, někdy i déle. Postupně se snižují intervaly mezi záchvaty kašle a nemoc přechází do rekonvalescentního stádia, trvajícího přibližně týden až měsíc. Stále dochází k záchvatům kašle, postupně ale klesá jejich síla a četnost (Beneš, 2009).

V průběhu onemocnění se mohou objevovat komplikace. Mezi časté patří pneumonie, lymfocytóza, zánět středního ucha (převážně u dětí) a encefalopatie. K encefalopatii dochází díky silným záchvatům kašle, kdy se pacient nedokáže nadechnout, což způsobí nedostatečné okysličení tkání (hypoxii) a poškození mozku. Dalšími komplikacemi může být zlomení žeber, prasknutí bránice, krvácení z nosu a další (Mattoo & Cherry, 2005).

3.4 Diagnostika

První úsudky může lékař provádět na základě klinického obrazu pacienta. Průběh dávivého kašle ale může být lehký až asymptomatický. Posouzením klinického

obrazu tedy nejde infekci *B. pertussis* (případně *B. parapertussis*) bezpečně vyloučit. Další postup se odvíjí na základě doby trvání příznaků.

3.4.1 Kultivace

Kultivace se provádí ze stěru zadní stěny nosohltanu na speciálních plotnách obsahujících Bordet-Gengou agar nebo Regan-Lowe agar. Plotny jsou inkubovány při 35-36 °C při zvýšené vlhkosti vzduchu po dobu 3-7 dnů. Kultivace lze využít v prvních 2 týdnech trvání obtíží, později již není relevantní. Jedná se o vyšetření vysoce specifické a nenáročné, bohužel ale málo senzitivní (Cohen et al., 2014; Zavadilová et al., 2009).

3.4.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je vyšetření specifické a senzitivnější než kultivace, ale na druhou stranu méně dostupné. PCR se provádí opět ze stěru provedeného odběrovou tyčinkou ze zadní stěny nosohltanu. Vzhledem k poklesu bakteriální DNA je možné použít PCR přibližně do 3 týdnů od počátku příznaků (Cohen et al., 2014; Fabiánová & Zavadilová, 2011).

3.4.3 Serologické vyšetření

Dávivý kašel lze prokázat pomocí serologických metod, nejčastěji využitím metody ELISA (z anglického enzyme-linked immunosorbent assay). Touto metodou se analyzuje koncentrace specifických protilátek imunoglobulinu G (IgG), případně imunoglobulinu A (IgA). Nejvhodnější je měřit koncentraci PTX specifických IgG protilátek. K vyšetření se odebírají dva vzorky krve v intervalu tří týdnů (Vyhláška MZČR č. 473/2008 Sb.). Porovnáním hladiny protilátek v jednotlivých vzorcích se určuje výsledek vyšetření. Pokud jsou odběry prováděny příliš brzy po vakcinaci, mohou být výsledky falešně pozitivní. U novorozenců mohou být hladiny naopak velmi nízké až nedetekovatelné (Fabiánová & Zavadilová, 2011; Zavadilová et al., 2009).

Vzhledem k rychlému dosažení výsledků a vysoké specifitě je nejvhodnější využívat metodu PCR. Izolovaný kmen *B. pertussis* a *B. parapertussis* je laboratoř

v České republice povinna zaslat do Národní referenční laboratoře pro pertusi a diftérii (Vyhláška MZČR č. 473/2008 Sb.).

3.5 Terapie

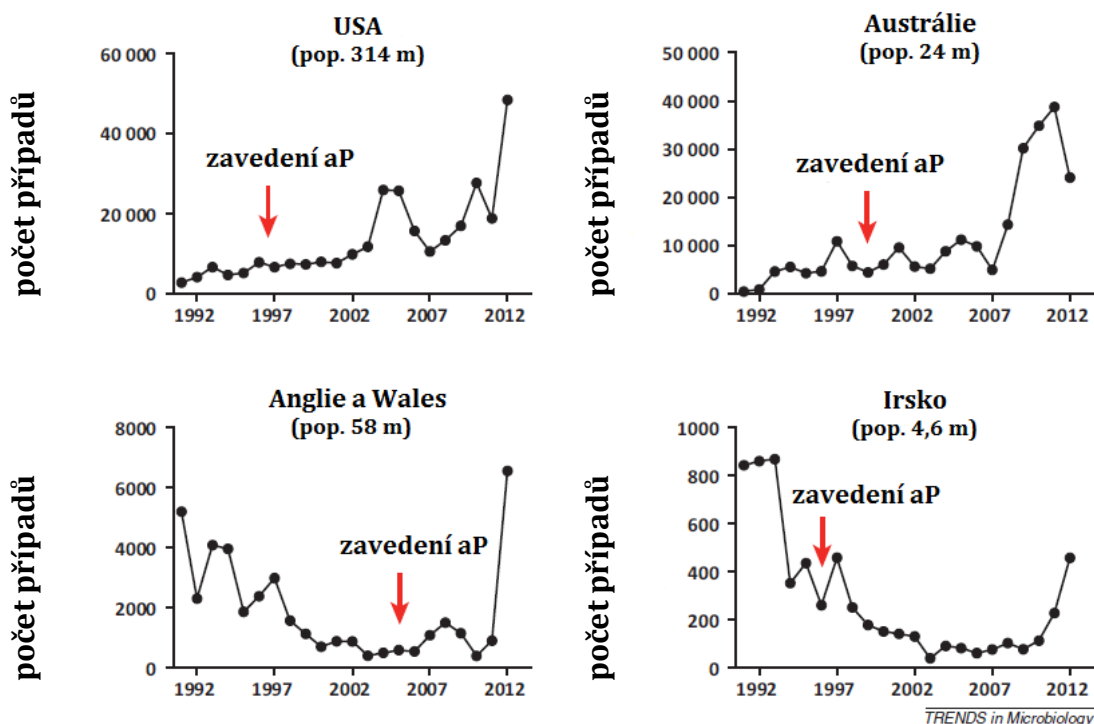
Léčbu je důležité zahájit co nejdříve po pozitivním nálezu *B. pertussis* v nosohltanu, aby se zabránilo především šíření infekce (PHAC, 2003). Průběh onemocnění je zpravidla zachycen až v paroxysmální fázi, kdy už jej léčba nedokáže ovlivnit (Wirsing von König et al., 1998). Léčba, která je zahájena ještě v průběhu katarálního stádia, může zmírnit průběh onemocnění (Bergquist et al., 1987).

K léčbě dávivého kašle se používají makrolidová antibiotika, převážně azithromycin, clarithromycin a erythromycin. Obvyklá délka je 5-7 dní (Aoyama et al., 1996; Halperin et al., 1997). Po uplynutí této doby by již pacient neměl být infekční (PHAC, 2003). Od používání erythromycinu se ale postupně upouští, protože může u pacientů způsobovat gastrointestinální problémy a zvyšuje riziko hypertonické stenózy pyloru u dětí do 2 týdnů věku (Cooper et al., 2002; Halperin et al., 1997).

4 Epidemiologie dávivého kašle

V dobách, kdy ještě nebyly dostupné vakcinační látky, byl dávivý kašel běžné infekční onemocnění s relativně vysokou dětskou úmrtností (CDC, 2012). Ve Spojených státech amerických se výskyt pertuse pohyboval nad 100 000 případů za rok. Pod tuto hranici se dostal až v roce 1948 po zavedení očkování (CDC, 2014). V roce 2008 bylo celosvětově hlášeno přibližně 16 milionů případů, z čehož 95 % bylo v rozvojových zemích. V důsledku pertuse zemřelo minimálně 195 000 dětí (Black et al., 2010).

Navzdory vysoké proočkovanosti byl zaznamenán vzestup například ve Spojených státech amerických, Japonsku, Austrálii, Evropě a další části světa neustále přibývají (WHO, 2013a; WHO, 2013b). V Kalifornii v roce 2010 proběhla epidemie, při které bylo zaznamenáno nejvíce případů za posledních 53 let (Winter et al., 2012). Narůstající výskyt onemocnění se týká především ekonomicky rozvinutých zemí, kde se využívá acelulární vakcína (graf 4-1).



Graf 4-1 Hlášené případy v období 1991-2012

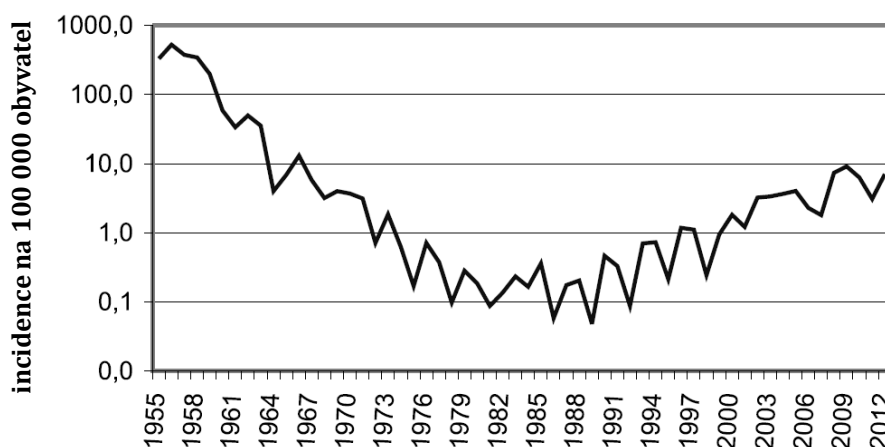
Červená šipka značí zavedení acelulární (aP) vakcíny. V závorce je uvedena velikost populace (pop.) v roce 2012. Převzato a upraveno z: (Mills et al., 2014)

Počet úmrtí je stále výrazně nižší než v prevakcinační éře, přesto jejich míra stále stoupá. Ze statistik vyplývá, že 96 % úmrtí se týká dětí mladších 4 měsíců (Haberling et al., 2009). V prevakcinační éře bylo nejvíce případů zaznamenáno ve věkové kategorii do 11 let (CDC, 2012). V posledních letech dochází k posunu do vyšších věkových kategorií, což může být způsobeno klesající ochranou navozenou acelulární vakcínou (Misegades et al., 2012; Witt et al., 2012).

Epidemie dávivého kašle se opakují ve 2-4letých cyklech. Proč se tak děje, není zatím objasněno.

4.1 Situace v České republice

Zatím nejvyšší počet případů (po roce 1945) byl hlášen v roce 1956 - 520 případů na 100 000 obyvatel. Očkování proti pertusi, zavedené dva roky poté, incidenci výrazně snížilo (Fabiánová et al., 2009). Nejméně případů se vyskytlo v roce 1989 - pouhých 5. V 90. letech 20. století i Česká republika zaznamenává zvyšující se trend nemocnosti (graf 4.1-1). V roce 2013 se jedná dokonce o rekordní počet případů za posledních více než 40 let (SZÚ, 2014b). Hodnoty se vyšplhaly až na číslo 1 233. Bohužel, za první 4 měsíce v roce 2014 bylo zaznamenáno už 868 případů, zatímco v roce 2013 jich bylo za stejné období hlášeno pouze 250 (SZÚ, 2014a). V roce 2014 se tedy očekává výrazné přesáhnutí hodnot z roku 2013.

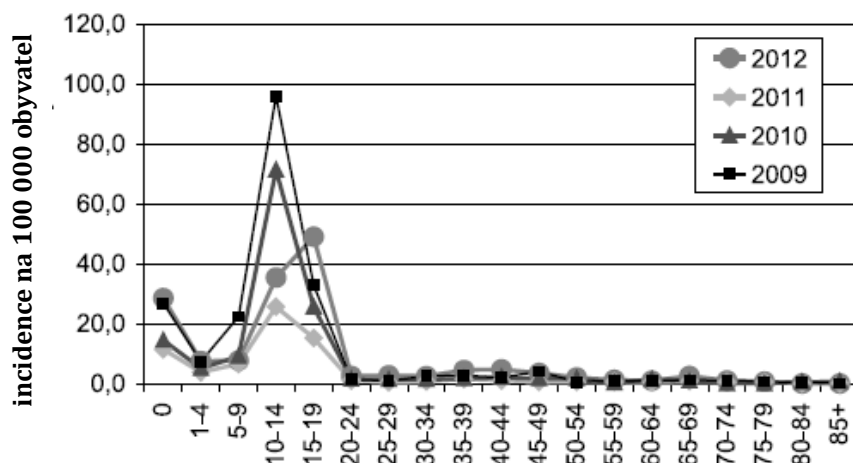


Graf 4.1-1 Epidemiologická situace v ČR za období 1955-2012 (semilog.)

Převzato z: (Fabiánová et al., 2013)

Stejně jako ve světě se i v ČR opakují 2-4leté epidemické cykly (Fabiánová et al., 2011). Nejvyšší počet případů se týká pravidelně kategorie 10-14 let (Fabiánová et

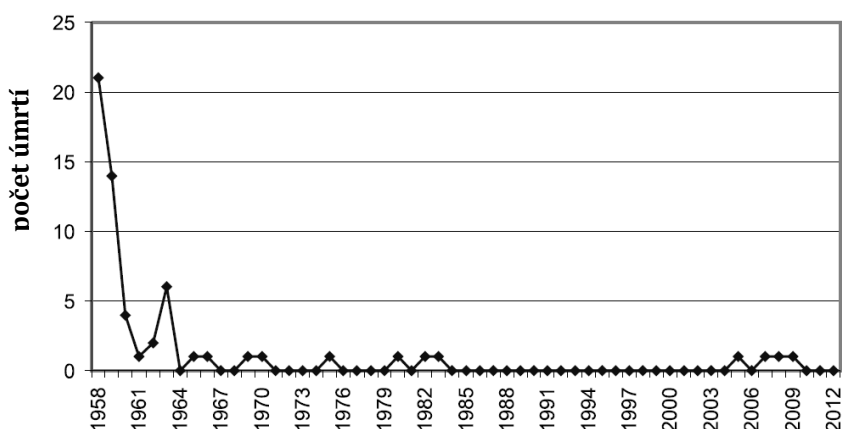
al., 2009). V roce 2012 došlo k posunu nejvyššího počtu případů do věkové kategorie 15-19 let (graf 4.1-2). V roce 2011 bylo v této věkové skupině hlášeno 85 případů, v roce 2012 již 265 (Fabiánová et al., 2013).



Graf 4.1-2 Zastoupení věkových skupin hlášených případů v ČR

Převzato z: (Fabiánová et al., 2013)

Před zavedením očkování bylo úmrtí v důsledku dávivého kašle relativně časté. Česká republika měla v období 1949-1956 hlášeno 2972 případů úmrtí, z čehož 96 % byly děti do tří měsíců věku (Procházka & Kryl 1959). V současné době jsou případy úmrtí zaznamenávány výjimečně (graf 4.1-3). Za posledních 30 let byly hlášeny 4 úmrtí a vždy se jednalo o děti mladší jednoho roku (Fabiánová et al., 2013). Se zvyšujícím se výskytem pertuse se ale očekává i nárůst počtu úmrtí.



Graf 4.1-3 Počet úmrtí v ČR za období 1958-2012

Převzato z: (Fabiánová et al., 2013)

5 Očkování

Primárně se dělí očkovací látky na celobuněčné (wP) a acelulární (aP). Celobuněčné vakcíny obsahují oslabenou nebo usmrcenou bakterii, acelulární vakcíny jsou tvořeny pouze vybranými purifikovanými antigeny *B. pertussis*. Acelulární, neboli podjednotkové, vakcíny zpravidla obsahují 1-5 antigenů (PTX, FHA, PRN, FIM2, FIM3). Obecně platí, že vakcíny obsahující více komponent jsou účinnější (Greco et al., 1996; Gustafsson et al., 1996)

Celobuněčné i acelulární očkovací látky jsou většinou kombinované, nejčastěji s toxoidem tetanu a diftérie. Celobuněčné vakcíny se potom označují jako DTP, acelulární jako DTaP. V ekonomicky vyspělých zemích se vzhledem k nežádoucím účinkům celobuněčných vakcín často využívají vakcíny acelulární. Pro přeočkování se používá Tdap, tedy látka obsahující tetanový toxoid, redukovaný záškrťový toxoid a purifikované antigeny *B. pertussis*.

Současné vakcíny nejsou účinné proti infekci *B. parapertussis* (David et al., 2004; Willems et al., 1998).

5.1 Historie očkování

Onemocnění dávivým kašlem se vyskytovalo velmi často a vzhledem k vysokému počtu úmrtí u dětí byly ve 40. letech 20. století zavedeny celobuněčné vakcíny. S nástupem očkování začal počet případů onemocnění a úmrtí klesat, čímž se dostal pod historická minima. Celobuněčná vakcína byla bohužel velmi reaktogenní a způsobovala mnoho vedlejších účinků. Například otoky a bolest v místě vpichu či neustávající pláč dítěte (Cody et al., 1981; Walker et al., 1988). V některých zemích, jako je například Japonsko či Švédsko, se na základě těchto zjištění očkování na nějakou dobu úplně pozastavilo (Locht & Mielcarek, 2012).

Druhým zásadním problémem celobuněčné vakcíny byla její nedefinovanost a nehomogenost jednotlivých šarží. Kmen pro vakcínu byl napěstován ve velkém množství bez kontroly exprese jednotlivých antigenů. Prováděl se pouze Kendrickův test, který spočívá v aplikaci *B. pertussis* přímo do mozku myši. Pro

nedostatečně imunizovanou myš celobuněčnou vakcínou je tato infekce letální (Kendrick, 1947; cit. dle Mills & Gerdt, 2014).

Tato negativa vedla ke snaze vyvinout novou vakcínu, která by byla méně reaktogenní, více definovaná a dostatečně efektivní.

V 90. letech 20. století byla vyvinuta acelulární vakcína, která postupně nahradila celobuněčnou. Klinické testy prokázaly, že je méně toxická a dostatečně efektivní (Greco et al., 1996). Kendrickův test se již pro testování efektivity vakcín nepoužívá. Není relevantní pro lidskou imunitní reakci a acelulární vakcína nedokáže v myši zabránit letální infekci (Mills & Gerdt, 2014). Vzhledem k vysoké nákladnosti acelulární vakcíny využívá velká část světa stále vakcínu celobuněčnou (Locht v Mielcarek, 2012).

5.2 Očkování v České republice

V České republice se očkuje proti pertusi od roku 1958. V současné době se používá acelulární pertusová vakcína, která byla v České republice uvedena na trh v roce 2003 (Fabiánová et al., 2009). Od roku 2007 se aplikuje hexavalentní očkovací látka poskytující ochranu proti záškrtu, tetanu, pertusi, dětské obrně, žloutence typu B a proti onemocnění vyvolanému *Haemophilus influenzae* typu B (Blechová, 2010; Fabiánová et al., 2013).

Očkování proti dávivému kašli je v České republice povinné a při jeho odmítání hrozí sankce v podobě pokuty. Vyhláška číslo 537/2006 Sb., upravená vyhláškou číslo 65/2009 Sb., o očkování proti infekčním nemocem vydaná Ministerstvem zdravotnictví ČR přesně udává věk, ve kterém se aplikují jednotlivé dávky hexavalentní očkovací látky (Vyhláška MZČR č. 537/2006 Sb.). První tři dávky se aplikují v rozmezí devátého týdne věku dítěte až jednoho roku, vždy s minimálním rozestupem jednoho měsíce mezi jednotlivými dávkami. Čtvrtá dávka následuje s minimálním rozestupem šesti měsíců od podání třetí dávky vakcinační látky. První přeočkování se provádí v rozmezí od dovršení pátého roku po dovršení šestého roku dítěte. Druhé přeočkování pak od dovršení desátého roku po dovršení jedenáctého roku (Vyhláška MZČR č. 65/2009 Sb.). Podobný očkovací kalendář využívá většina zemí, ve kterých se očkuje proti dávivému kašli.

6 Návrat dávivého kašle

6.1 Důvody narůstajícího počtu případů

Příčina neustále narůstajícího počtu případů v posledních letech pravděpodobně není pouze jedna. Vyšší povědomí populace o onemocnění, spolu s využitím senzitivnějších diagnostických metod (PCR) pomáhá zachytit i případy, které by byly dříve hodnoceny jako negativní. Zhoršení situace může být i následkem přechodu z celobuněčné vakcíny na acelulární, které proběhlo v 90. letech 20. století. Imunita navozená acelulární vakcínou není dostatečně efektivní a postupně klesá. Při rozboru dat z období 1998-2008 v ČR bylo zjištěno, že 75,3 % registrovaných nemocných mělo úplné očkování, tedy pět dávek (Fabiánová et al., 2009). Nižší cirkulace patogenu v populaci v porovnání s prevakcinační érou zároveň neumožňuje přirozené posilování imunity po kontaktu s bakterií (Guiso, 2014). Důležitou roli pravděpodobně hraje i genetická diverzifikace současných klinických izolátů jako důsledek zavedení očkování (viz kapitola 6.1.3). Spekuluje se, že acelulární vakcíny neobsahují vhodnou kombinaci specifických antigenů, které jsou odpovědné za navození adekvátní imunitní odpovědi (Mills et al., 2014).

Stejně tak roste počet odpůrců očkování, kteří odmítají nechat očkovat sebe i své děti. Matky si bohužel zpravidla neuvědomují, že odmítnutím jakéhokoliv očkování navyšují cirkulaci patogenů v populaci. Tento nárůst bude zaznamenán až časem a bude představovat již zásadní problém pro další generaci. V té době již budou děti ohroženy na životě.

6.1.1 Navození nedostatečné a krátkodobé imunity

Imunita indukovaná celobuněčnou vakcínou má v porovnání s acelulární vakcínou dlouhodobější charakter (Smits et al., 2013). S rostoucím intervalem od poslední dávky acelulární vakcíny se zvyšuje pravděpodobnost jejího selhání (Misegades et al., 2012). Přibližně po 5 letech od poslední aplikované dávky byl zaznamenán výrazný pokles ochrany, který dále klesá (Klein et al., 2012). Studie, která se zabývá dětmi právě 5 let po primárním očkování, prokázala, že tyto děti mají výrazně vyšší koncentraci specifických protilátek než děti, jimž nebyla aplikována další dávka acelulární vakcíny (Carollo et al., 2014). Toto zjištění potvrzuje nutnost

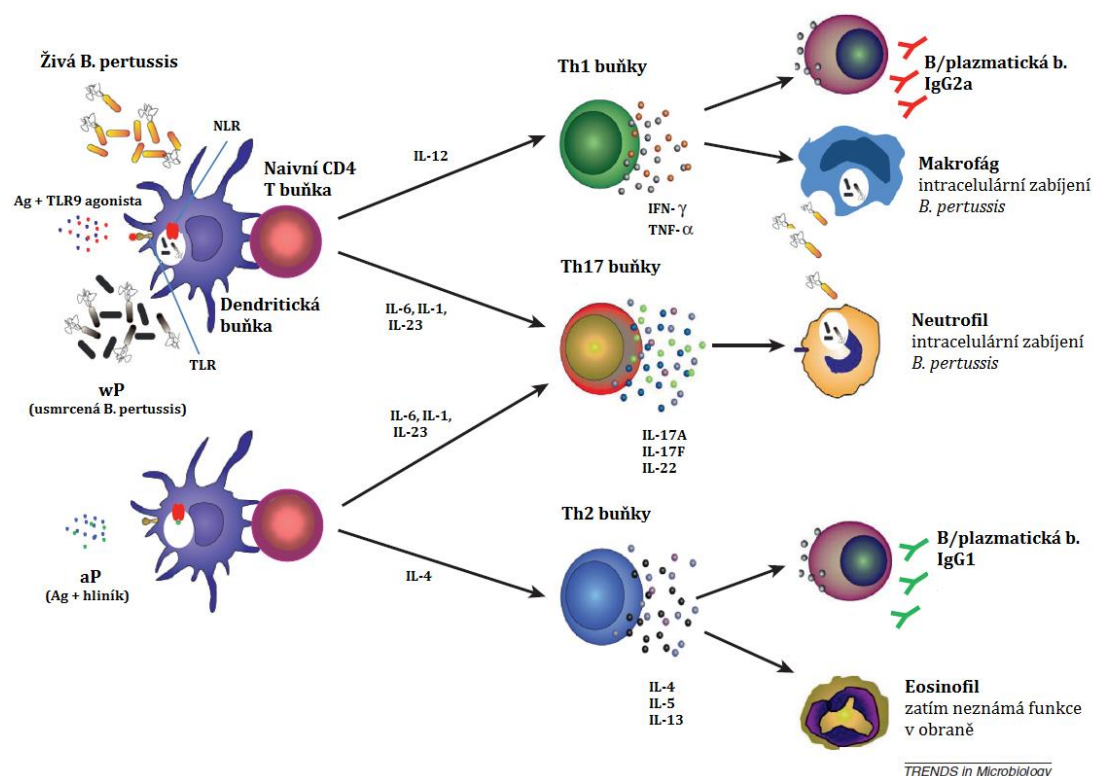
přeočkování nejpozději 5 let po primární vakcinaci. Míra výskytu onemocnění u dětí, které byly očkovány pouze acelulární vakcínou, je dokonce vyšší než u dětí s minimálně jednou dávkou vakcíny celobuněčné (Witt et al., 2013).

Při pokusech na paviánech anubi (*Papio anubis*) se ukázalo, že současná podoba acelulární vakcíny dokáže sice v očkovaném jedinci zabránit příznakům onemocnění, ale nedokáže zabránit kolonizaci dýchacích cest a přenosu na jedince v okolí. Navíc bylo zjištěno, že zvířata očkováná celobuněčnou vakcínou byla schopna se zbavit infekce rychleji, než zvířata očkováná acelulární vakcínou (Warfel et al., 2014).

6.1.2 Nevhodná imunitní odpověď

Aktuální studie ukazují zásadní problém týkající se vyvolané imunitní odpovědi na acelulární vakcínu. Celobuněčné vakcíny indukují Th1 a Th17 imunitní odpověď. Jedná se o podobnou, ale slabší imunitní odpověď jakou vyvolává přirozená infekce bakterií (Higgs et al., 2012; Redhead et al., 1993; Warfel et al., 2014). Pro boj s *B. pertussis* je zásadní Th1 imunitní odpověď. Th1 buňky produkují IFN- γ aktivují makrofágy, čímž zajišťují boj s intracelulárními mikroorganismy (obrázek 6.1.2-1). Hlavní funkcí Th17 buněk je prozánětlivá reakce vedoucí k migraci neutrofilů do místa zánětu (Ross et al., 2013).

Současné acelulární vakcíny využívající soli hliníku jako adjuvans, látku podporující imunitní reakci, indukují suboptimální Th2, nebo smíšenou Th1/Th2, a Th17 imunitní odpověď (obrázek 6.1.2-1). Th2 imunitní odpověď je důležitá pro boj s extracelulárními parazity a spolupracuje převážně s neutrofily (bazofily, eosinofily) (Ross et al., 2013; Warfel et al., 2014).



Obrázek 6.1.2-1 Mechanismus imunitní odpovědi.

Infekce živou *B. pertussis* či imunizace celobuněčnou vakcínou (wP) [obsahující specifické antigeny (Ag), TLR9 agonisty – například LOS, a NLR agonisty aktivující dendritické buňky] indukuje diferenciaci naivních CD4 T buněk na efektorové Th1 (produkující IFN- γ a TNF- α) a Th17 buňky. Th1 a Th17 buňky jsou odpovědné za adekvátní imunitní odpověď na infekci *B. pertussis*. Aktivace neutrofilů, makrofágů a produkce opsonizačních protilátek (IgG2a) plazmatickými buňkami zajišťuje zabíjení *B. pertussis*. Acelulární vakcína (aP) je tvořena specifickými antigeny a soli hliníku jako adjuvans. aP aktivuje dendritické buňky, čímž indukuje diferenciaci naivních T buněk na efektorové Th2 a Th17 buňky produkující specifické interleukiny. To vede k aktivaci neutrofilů, eosinofilů a k produkci toxin neutralizujících protilátek (IgG1) plazmatickými buňkami. Převzato a upraveno z: (Mills et al., 2014)

6.1.3 Genetické změny cirkulujících kmenů

Dalším problémem není pouze klesající imunita navozená očkováním, ale i genetické změny cirkulujících kmenů *B. pertussis*. Současné klinické izoláty se začínají významně lišit od kmenů z prevakcinační éry.

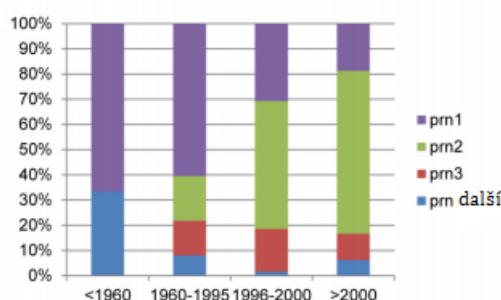
Genomická studie klinických izolátů z období 1920-2010 ukazuje, že mutace se týkají převážně antigenních faktorů PRN, PTX a FIM, které jsou obsaženy v acelulárních vakcínách. K těmto genetickým změnám dochází pravděpodobně díky selekčnímu tlaku vakcinací (Bart et al., 2014; Octavia et al., 2012). Kmeny nesou dříve méně frekventované alely nebo neexprimují některé antigeny vůbec.

Tyto kmeny jsou infekční i přesto, že neexprimují faktory virulence, které byly dlouho považovány za nezbytné (Guiso & Bodilis, 2013).

6.1.3.1 Pertaktin

Izolace kmenů neexprimujících pertaktin je jednou z významných genetických změn (Barkoff et al., 2012; Hegerle et al., 2012; Queenan et al., 2013). Ve Francii byly takové kmeny poprvé izolovány a popsány v roce 2007 (Bouchez et al., 2009). Frekvence jejich výskytu ve světě neustále roste. V Austrálii například za období 2008-2012 30 % všech izolátů neprodukovalo pertaktin (Lam et al., 2014). Ještě výraznější situace byla zaznamenána v New Yorku, kde byly analyzovány klinické izoláty z období 2004-2013. Až do roku 2010 bylo pertaktin-negativních kmenů méně než 3 % ze všech klinických izolátů. Od roku 2011 do roku 2013 jich bylo více než 65 %. Důvodem byla například inserce IS elementu nebo úplná delece genu pro PRN (Quinlan et al., 2013). U kmenů neexprimujících PRN nebyla pozorována snížená virulence (Guiso & Bodilis, 2013).

Druhá genetická změna se týká zastoupení jednotlivých alel v klinických izolátech (graf 6.1.3.1-1). Dříve převládající alela *prn1* byla nahrazena alelami *prn2* a *prn3*, následně převládla *prn2* alela. Alela *prn1* se vyskytuje převážně v neočkovaných populacích, *prn2* a *3* hlavně v těch očkovaných (van Gent et al., 2011; Schmidtke et al., 2012).



Graf 6.1.3.1-1 Frekvence výskytu alel *prn*. Převzato z: (Bart et al., 2014)

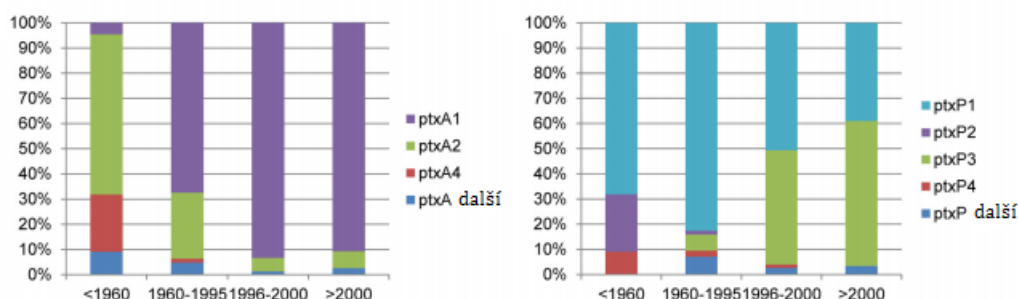
6.1.3.2 Pertusový toxin

První z genetických změn se týká alely promotoru *ptxP* (graf 6.1.3.2-1). Dříve převládala *ptxP1* alela, která byla v posledních letech nahrazena *ptxP3* alelou (Advani et al., 2013; Mooi et al., 2009; Quinlan et al., 2013). Ve Finsku byla

například tato alela identifikována poprvé v roce 1994 a postupně frekvence jejího výskytu narůstá (Kallonen & Mertsola, 2012). Vyšší výskyt této alely se týká i dalších evropských zemí, Austrálie a Spojených států amerických (Advani et al., 2011; Octavia et al., 2012; Schmidtke et al., 2012).

Kmeny s *ptxP3* alelou produkují o něco méně PRN, ale mnohem více PTX oproti kmenům s alelou *ptxP1*. Kmeny s alelou *ptxP3* jsou více virulentní a jsou méně senzitivní na regulaci fázové změny pomocí sulfátu (de Gouw et al., 2014; Mooi et al., 2009).

Další genetická změna se týká podjednotky A pertusového toxinu (graf 6.1.3.2-1). Alela *ptxA1* postupem času nahradila alely *ptxA2* a *ptxA4* (Lam et al., 2012).

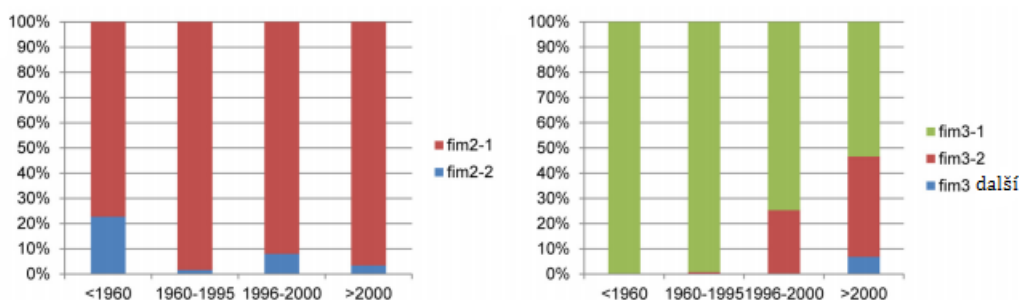


Graf 6.1.3.2-1 Frekvence výskytu alel *ptxA* a *ptxP*. Převzato z: (Bart et al., 2014)

6.1.3.3 Fimbrie

Genetické změny se týkají obou sérotypů *B. pertussis* (graf 6.1.3.3-1). Alela *fim3-1* je postupně nahrazována alelou *fim3-2*, která byla poprvé identifikována po zavedení celobuněčných vakcín. Po přechodu na acelulární vakcíny frekvence výskytu na světě stoupla na 37 % (Bart et al., 2014). Ve Spojených státech amerických 82 % klinických izolátů z období 2006-2009 obsahovalo alelu *fim3-2* (Schmidtke et al., 2012).

Mírné genetické změny se týkají i zastoupení alel *fim2*. V analyzovaném období ale vždy výrazně převažovala alela *fim2-1* nad alelou *fim2-2* (Bart et al., 2014).



Graf 6.1.3.3-1 Frekvence výskytu *fim2* a *fim3* alel. Převzato z: (Bart et al., 2014)

6.2 Epidemiologická opatření

V obecném zájmu je nutné pracovat na vývoji nových vakcín, které budou dostatečně efektivní a navodí dlouhodobou imunitu proti pertusi. Do té doby je ale potřeba pracovat s vakcínami, které jsou k dispozici a pomocí několika strategií se pokusit zabránit šíření dávivého kašle. Nejvíce jsou ohroženy děti do 3 měsíců, které zatím ještě nebyly dostatečně očkovány. Strategie prevence se zaměřují právě na jejich ochranu.

6.2.1 Očkování matek v průběhu těhotenství

Jednou z možností je očkovat ženy ještě během těhotenství pomocí Tdap. Pro dosažení nejvyšších účinků se jako nejvhodnější doba pro očkování uvádí 27.-36. týden těhotenství (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013). Studie prokázaly, že dochází k aktivnímu transplacentárnímu přenosu protilátek z matky na plod (Healy et al., 2004, 2006; Van Savage et al., 1990). I přesto, že poločas života těchto protilátek je přibližně 6 týdnů (Van Savage et al., 1990), poskytnou novorozenci zvýšenou ochranu v době, kdy ještě nemůže být očkovan. Po očkování nebyly zaznamenány žádné negativní vlivy na vývoj plodu v průběhu těhotenství (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013).

6.2.2 „Cocoon“ strategie

Hlavním zdrojem infekce jsou v 75 % případů nejbližší příbuzní, matka je zdrojem až v 35 % případů (Bisgard et al., 2004; Izurieta et al., 1996; Wendelboe et al., 2007). Z tohoto důvodu byla Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí ve Spojených státech v roce 2006 doporučena takzvaná „cocoon“ strategie (CDC, 2006). Spočívá v očkování rodičů, nejbližších členů rodiny a osob, které mohou být

v úzkém kontaktu s dítětem. Jejím cílem je co nejvíce zamezit možnosti výskytu infekce v okolí novorozence a tím zabránit přenosu.

Očkování adolescentů a dospělých se doporučuje minimálně 2 týdny před kontaktem s ohroženým jedincem (Haberling et al., 2009). Stejně tak se doporučuje vakcinace lékařů, zdravotních sester a nemocničního personálu, obzvláště v porodnicích (CDC, 2011).

7 Vývoj nových vakcín

Současné acelulární vakcíny jsou sice méně účinné, ale i přesto snižují počet případů a oproti celobuněčným vakcínám jsou méně reaktogenní. U nových vakcín je proto hlavním cílem dosažení vyšší účinnosti a zároveň snížení vedlejších účinků.

Existuje několik možností, jak se pokusit dostat infekci *B. pertussis* pod kontrolu. Patří mezi ně modifikace specifických antigenů současných acelulárních vakcín, nová formulace vakcíny či vývoj úplně nové celobuněčné vakcíny. K efektivnějším studiím přispěje i využití nového zvířecího modelu, paviána anubi (*Papio anubis*), který narozdíl od myši imituje lidský průběh infekce *B. pertussis* (Warfel et al., 2012b).

Je ale nutné si uvědomit, že vývoj nové vakcíny představuje finančně náročný a dlouhodobý proces. Studie na zvířecích modelech musí prokázat nízkou toxicitu, dostatečnou efektivitu a schopnost navození dlouhodobé imunity. Před uvedením na trh je nutné provést klinické testy, které prokáží, zda je stejně účinná a bezpečná i pro lidi.

7.1 Modifikace antigenů současných vakcín

Přidání dalšího antigenu do současných acelulárních vakcín představuje způsob, jak zlepšit jejich účinnost. Mezi vhodné adepty patří například ACT, který má adjuvantní efekt (Macdonald-Fyall et al., 2004). Přidání enzymaticky neaktivního ACT do acelulární vakcíny navozuje zvýšenou ochranu ve zvířecím modelu (Cheung et al., 2006).

Další možností je přidání autotransportéru BrkA, jehož exprese je regulována pomocí Bvg systému. Přidání proteinu BrkA do vakcíny obsahující PTX a FHA zajistí stejnou efektivitu, jako mají běžně používané tříkomponentní očkovací látky. Zvýšená protekce překvapivě nebyla pozorována po přidání BrkA do tříkomponentní nebo celobuněčné vakcíny (Marr et al., 2008).

Vhodným antigenem se také jeví povrchový protein IRP1-3, který je exprimován při nízkých hladinách železa v prostředí. Jeho exprese tedy není závislá na virulentní fázi bakterie. IRP1-3 je vysoce imunogenní a navozuje ochranu proti infekci *B. pertussis* v myším modelu. Analýzou současných klinických izolátů bylo zjištěno, že se jedná o konzervovaný gen (Alvarez Hayes et al., 2011).

Protein AfuA je velmi podobný proteinu IRP1-3. Je exprimován na buněčném povrchu při nízkých koncentracích železa, není regulován Bvg systémem a je geneticky konzervovaný. Přidání AfuA do DTaP vakcíny výrazně zvýší její schopnost ochrany v myším modelu. Ještě vyšší ochranu zajistí přidání IRP1-3 i AfuA zároveň (Alvarez Hayes et al., 2013).

7.2 Nová formulace vakcíny

7.2.1 Vhodné adjuvans

Kanadská vědecká skupina vyvinula novou formu vakcíny tvořenou detoxifikovaným pertusovým toxoidem a třemi adjuvantními látkami: CpG oligodeoxynukleotidy, polyfosfazenem a kationickými regulačními peptidy účastnícími se obrany navozené vrozenou imunitou (Gracia et al., 2011). CpG oligodeoxynukleotid je agonistou receptoru TLR9, který spouští kaskádu vedoucí ke vzniku Th1 imunitní odpovědi (McCluskie & Davis, 1999). Tato kombinace adjuvans dokáže u novorozenech myši stimulovat imunitní systém ke vhodné imunitní odpovědi (Th1) i v přítomnosti maternálních protilátek, které mohou ovlivňovat efektivitu vakcinační látky (Polewicz et al., 2011). Formulace vakcíny do mikročástic, jež brání degradaci a rozpoznání maternálními protilátkami, zajistí ještě výraznější tvorbu protilátek (Garlapati et al., 2011; Polewicz et al., 2013).

V porovnání s hlinitými solemi indukuje CpG oligonukleotid jako adjuvans žádanou Th1, Th17 imunitní odpověď a vyšší produkci specifických protilátek (Ross et al., 2013). Dokáže také navodit změnu Th2 odpovědi na Th1. V kombinaci s hlinitými solemi překvapivě indukuje ještě silnější Th1 odpověď než CpG oligodeoxynukleotid samotný (Asokanathan et al., 2013).

7.2.2 Izolování vezikulů z vnější membrány bakterie

Aktuální studie ukazují, že vezikuly izolované z vnější membrány *B. pertussis* by mohly být využity jako očkovací látka (Roberts et al., 2008). Tyto váčky obsahují více jak 40 proteinů, mezi nimiž jsou i důležité antigeny jako je PRN, ACT, PTX a LOS. Přítomnost takového množství antigenů je nespornou výhodou oproti klasickým acelulárním vakcínám.

Přítomnost LOS ve vezikulech zvyšovala toxicitu, proto bylo důležité dosáhnout jejího snížení. Kmeny byly geneticky upraveny tak, aby obsahovaly funkční gen pro PagL protein (u *B. pertussis* je tento gen porušen), který hydrolyzuje esterovou vazbu na třetí pozici lipidu A. Zajistí tak snížení toxicity (Asensio et al., 2011; Geurtsen et al., 2006). Izolování váčků z takto upravených kmenů a jejich přidání do acelulární vakcíny zvyšuje účinnost ochrany proti různým genotypům *B. pertussis*. Tedy i proti současným izolátům obsahujícím rozdílné alely antigenů, jež nejsou obsaženy v současných vakcínách (Emilia et al., 2014).

Vezikuly izolované z *B. parapertussis* dokážou navodit imunitu proti *B. parapertussis* i *B. pertussis* (Bottero et al., 2013). Jsou dokonce stejně účinné jako vezikuly izolované z *B. pertussis*. Pro navození ochrany proti infekci *B. parapertussis* je zásadní přítomnost O-antigenů v LPS *B. parapertussis*. Jeho přidáním do acelulárních vakcín se zvýší ochrana proti infekci *B. parapertussis* (Zhang et al., 2009).

7.3 Vývoj nové celobuněčné vakcíny

Celobuněčné vakcíny jsou efektivnější a ekonomicky méně náročné než acelulární vakcíny. Výhodou celobuněčných vakcín je fakt, že obsahují celou bakterii, tedy veškeré antigeny nutné pro navození adekvátní reakce imunitního systému. Na druhou stranu obsahují velké množství endotoxinu LOS, který má zásadní vliv na toxicitu vakcíny. Cílem několika vědeckých skupin je vytvořit celobuněčnou vakcínu s výrazně sníženou toxicitou, než měly vakcíny používané v minulosti.

7.3.1 Živý kmen

Snahou vědecké skupiny, pod vedením C. Lochta, je uvést na trh celobuněčnou vakcínu obsahující živý atenuovaný kmen BPZE1 (Mielcarek et al., 2006). Jedná se o vakcínu s intranasálním podáním, což mimikuje přirozenou infekci a může podpořit vznik slizniční imunity. Primárním cílem této vakcíny je očkování novorozenců, kterým ještě nemohla být aplikována vícesložková očkovací látka.

Genetická modifikace kmene byla zacílena na tři důležité faktory virulence: TCT, PTX a DNT. Gen *B. pertussis ampG* byl vyměněn za funkční gen *E. coli ampG* a tím se docílilo znovu využití TCT pro stavbu buněčné stěny. Nahrazení genu *ptx* za mutantní gen (obsahuje 2 bodové mutace v podjednotce S1) zapříčinilo produkci enzymaticky neaktivního PTX. Došlo k úplnému odstranění genu pro DNT. Tyto mutace kmen dostatečně oslabí, ale stále umožňují bakterii kolonizovat dýchací cesty. Vzhledem k tomu, že se jedná o celobuněčnou vakcínu obsahující živý kmen, je důležité, aby nedocházelo k jeho genetickým změnám. Opakované pasážování prokázalo genetickou stabilitu kmene (Feunou et al., 2008).

BPZE1 vakcína poskytuje vyšší ochranu a navozuje dlouhodobější imunitu (min. 1 rok bez poklesu) než použitá kontrolní acelulární vakcína (Feunou et al., 2010; Skerry & Mahon, 2011). Na myším modelu se prokázala důležitost funkční adenylát cyklázy pro patogenitu *B. pertussis*. Při delecí genu *cyaA* pro ACT v kmenu BPZE1 byla snížena schopnost kolonizovat dýchací cesty a tím snížena schopnost navození ochrany proti infekci (Feunou et al., 2010).

Podle studií je BPZE1 vakcína účinná i proti *B. parapertussis* narozdíl od acelulárních vakcín (Mielcarek et al., 2006). V první fázi klinických testů bylo prokázáno, že vakcína je bezpečná a kmen BPZE1 dokáže kolonizovat horní cesty dýchací (Thorstensson et al., 2014). Další fáze klinických testů jsou v přípravě.

7.3.2 Usmrcený kmen

Ve vývoji jsou i vakcíny obsahující usmrcenou *B. pertussis*, což byl princip dřívějších celobuněčných vakcín. Zásadní vliv na toxicitu celobuněčné vakcíny má především LOS. LOS je možné geneticky nebo chemicky detoxifikovat, případně úplně odstranit z vnější membrány.

V Brazílii prošla vakcína s detoxifikovaným LOS první fází klinických testů, kdy nebyly sledovány závažné nežádoucí účinky. Kmen byl detoxifikován opakovaným promýváním v organickém roztoku a následnou centrifugací a filtrací. Vakcína indukovala stejnou imunitní odpověď jako běžně užívaná celobuněčná vakcína. Je tedy předpokladem, že bude i dostatečně imunogenní (Zorzeto et al., 2009). Extrakce LOS nesnížila schopnost vakcíny dostatečně aktivovat imunitní systém (Dias et al., 2013).

8 Závěr

Aktuální studie potvrzují alarmující situaci, kdy současné acelulární vakcíny, používané především v rozvinutých zemích, nejsou schopné navodit dostatečnou a dlouhotrvající ochranu proti pertusi. Neustávající každoroční nárůst výskytu dávivého kašle může dostat společnost v těchto zemích až do stádia prevakcinační éry. Je tedy nutné okamžitě zahájit úpravu či vývoj nových vakcín, které budou dostatečně efektivní a navodí dlouhodobou imunitu. Na nové vakcíně pracuje mnoho vědeckých skupin a některé z nich už zahájily klinické testy.

Nezbytně nutné je zaměřit se na výzkum samotné bakterie *B. pertussis*. Mnoho mechanismů důležitých pro její virulenci stále ještě neznáme. Stejně tak jsou stále jen dohady, proč se opakují 2-4leté epidemiologické cykly. Větší porozumění fyziologii a patogenезi této bakterie výrazně usnadní boj s ní.

Vyšší informovanost populace o dávivém kašli by umožnila dodržování epidemiologických opatření, jejichž cílem je chránit především novorozence a malé děti. Nejedná se pouze o informovanost laické veřejnosti, ale především té odborné.

Epidemiologický nárůst by byl pravděpodobně mnohem strmější, kdyby se s očkováním úplně přestalo. I přes veškeré nedostatky současných vakcín mají osoby s aplikovanou acelulární vakcínou mírnější příznaky v průběhu infekce. Nadále jsou výrazně redukovány počty úmrtí oproti prevakcinační éře. Dokud nebude dokončen časově náročný proces vývoje nové vakcíny, je nutné pracovat se stávajícím materiálem.

9 Literatura

- Advani, A., Gustafsson, L., Åhrén, C., Mooi, F.R., and Hallander, H.O. (2011). Appearance of Fim3 and ptxP3-Bordetella pertussis strains, in two regions of Sweden with different vaccination programs. *Vaccine* 29, 3438–3442.
- Advani, A., Hallander, H.O., Dalby, T., Krogfelt, K.A., Guiso, N., Njamkepo, E., von Könning, C.H.W., Riffelmann, M., Mooi, F.R., Sandven, P., et al. (2013). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of Bordetella pertussis isolates circulating in Europe from 1998 to 2009. *J. Clin. Microbiol.* 51, 422–428.
- Alvarez Hayes, J., Erben, E., Lamberti, Y., Ayala, M., Maschi, F., Carbone, C., Gatti, B., Parisi, G., and Rodriguez, M.E. (2011). Identification of a new protective antigen of Bordetella pertussis. *Vaccine* 29, 8731–8739.
- Alvarez Hayes, J., Erben, E., Lamberti, Y., Principi, G., Maschi, F., Ayala, M., and Rodriguez, M.E. (2013). Bordetella pertussis iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine* 31, 3543–3548.
- American College of Obstetricians and Gynecologists (2013). Update on Immunization and Pregnancy : Tetanus , Diphtheria , and Pertussis Vaccination. *Obstet. Gynecol.* 121, 2011–2014.
- Aoyama, T., Sunakawa, K., Iwata, S., Takeuchi, Y., and Fujii, R. (1996). Efficacy of short-term treatment of pertussis with clarithromycin and azithromycin. *J. Pediatr.* 129, 761–764.
- Asensio, C.J. a, Gaillard, M.E., Moreno, G., Bottero, D., Zurita, E., Rumbo, M., van der Ley, P., van der Ark, A., and Hozbor, D. (2011). Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine* 29, 1649–1656.
- Asokanathan, C., Corbel, M., and Xing, D. (2013). A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against Bordetella pertussis. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 325–331.
- Barkoff, A.-M., Mertsola, J., Guillot, S., Guiso, N., Berbers, G., and He, Q. (2012). Appearance of Bordetella pertussis strains not expressing the vaccine antigen pertactin in Finland. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1703–1704.
- Bart, M., Harris, S., Advani, A., and Arakawa, Y. (2014). Global Population Structure and Evolution of Bordetella pertussis and Their Relationship with Vaccination. *MBio* 5, e01074–14.

Basler, M., Masin, J., Osicka, R., and Sebo, P. (2006). Pore-Forming and Enzymatic Activities of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Synergize in Promoting Lysis of Monocytes Pore-Forming and Enzymatic Activities of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Synergize in Promoting Lysis of Monocytes. *Infect. Immun.* 74, 2207–2214.

Beneš, J., 2009. *Infekční lékařství*, Praha: Galén, ISBN 978-80-7262-644-1

Bergquist, S.O., Bernander, S., Dahnsjö, H., and Sundelöf, B. (1987). Erythromycin in the treatment of pertussis: a study of bacteriologic and clinical effects. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6, 458–461.

Bisgard, K.M., Pascual, F.B., Ehresmann, K.R., Miller, C. a., Cianfrini, C., Jennings, C.E., Rebmann, C. a., Gabel, J., Schauer, S.L., and Lett, S.M. (2004). Infant Pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23, 985–989.

Black, R.E., Cousens, S., Johnson, H.L., Lawn, J.E., Rudan, I., Bassani, D.G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C.F., Cibulskis, R., et al. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 375, 1969–1987.

Blechová, Z. (2010). Pertuse – stále aktuální téma nejen u dětí. *Pediatr. pro Praxi* 11, 358–361.

Bottero, D., Gaillard, M.E., Errea, A., Moreno, G., Zurita, E., Pianciola, L., Rumbo, M., and Hozbor, D. (2013). Outer membrane vesicles derived from Bordetella parapertussis as an acellular vaccine against Bordetella parapertussis and Bordetella pertussis infection. *Vaccine* 31, 5262–5268.

Bouchez, V., Brun, D., Cantinelli, T., Dore, G., Njamkepo, E., and Guiso, N. (2009). First report and detailed characterization of B. pertussis isolates not expressing Pertussis Toxin or Pertactin. *Vaccine* 27, 6034–6041.

Carbonetti, N.H., Artamonova, G. V, Mays, R.M., and Worthington, Z.E. V (2003). Pertussis Toxin Plays an Early Role in Respiratory Tract Colonization by Bordetella pertussis. 71, 6358–6366.

Caroff M, Aussel L, Zarrouk H, Martin A, Richards JC, Thérissod H, Perry MB, Karibian D. (2001). Structural variability and originality of the Bordetella endotoxins. *Journal of Endotoxin Research* 7, 63-8.

Carollo, M., Pandolfi, E., Tozzi, A.E., Buisman, A.-M., Mascart, F., and Ausiello, C.M. (2014). Humoral and B-cell memory responses in children five years after pertussis acellular vaccine priming. *Vaccine* 32, 2093–2099.

Centers for Disease Control and Prevention (2011). Immunization of Health-Care Personnel). *MMWR*;60 (No.RR-7)

Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis Cases by Year (1922-2013) [online]. 17.2.2014 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting/cases-by-year.html>

Centers for Disease Control and Prevention (2006). Preventing Tetanus, Diphtheria, and Pertussis Among Adults: Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid and Acellular Pertussis Vaccine. MMWR;55 (No.RR-17)

Centers for Disease, Control & Prevention in Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases (2012). 215–232 (Public Health Foundation)

Cody, C.L., Baraff, L.J., Cherry, J.D., Marcy, S.M., and Manclark, C.R. (1981). Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics* 68, 650–660.

Cohen, S., Black, A., Ross, A., and Mandel, E.D. (2014). Updated treatment and prevention guidelines for pertussis. *JAAPA* 27, 19–25, quiz 26.

*Cone, T.C. (1970). Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640. *Pediatrics* 46, 522.

Cooper, W.O., Griffin, M.R., Arbogast, P., Hickson, G.B., Gautam, S., and Ray, W. a (2002). Very early exposure to erythromycin and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 156, 647–650.

Cowell, J.L., Hewlett, E.L., and Manclark, C.R. (1979). Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 25, 896–901.

Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A., and Miller, J.F. (2006). Species- and Strain-Specific Control of a Complex , Flexible Regulon by *Bordetella* BvgAS Species- and Strain-Specific Control of a Complex , Flexible Regulon by *Bordetella* BvgAS †. *J. Bacteriol.* 188, 1775–1785.

David, S., van Furth, R., and Mooi, F.R. (2004). Efficacies of whole cell and acellular pertussis vaccines against *Bordetella parapertussis* in a mouse model. *Vaccine* 22, 1892–1898.

Dias, W.O., van der Ark, A. a J., Sakauchi, M.A., Kubrusly, F.S., Prestes, A.F.R.O., Borges, M.M., Furuyama, N., Horton, D.S.P.Q., Quintilio, W., Antoniazi, M., et al. (2013). An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 339–348.

Dirix, V., Verscheure, V., Goetghebuer, T., Hainaut, M., Debrue, a S., Locht, C., and Mascart, F. (2009). Monocyte-derived interleukin-10 depresses the *Bordetella pertussis*- specific gamma interferon response in vaccinated infants. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1816–1821.

- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., and Leclerc, C. (2003). Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* 278, 38514–38521.
- Emilia, M., Bottero, D., Errea, A., Ormazábal, M., Zurita, M.E., Moreno, G., Rumbo, M., Castuma, C., Bartel, E., Flores, D., et al. (2014). Acellular pertussis vaccine based on outer membrane vesicles capable of conferring both long-lasting immunity and protection against different strain genotypes. *Vaccine* 32, 931–937.
- Fabiánová, K., & Zavadilová, J. (2011). Aktualizovaná doporučení pro laboratorní diagnostiku pertuse a parapertuse. *Zprávy Epidemiol. a Mikrobiol. (SZÚ, Praha)* 20, 142–144.
- Fabiánová, K., Kříž, B., Beneš, Č., and Summary, S. (2009). Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982 – 2009. *Zprávy Cent. Epidemiol. a Mikrobiol. (SZÚ, PRAHA)* 18, 368–370.
- Fabiánová, K., Zavadilová, J., Beneš, Č., and Kříž, B. (2011). Pertuse v České republice v roce 2010. *Zprávy Cent. Epidemiol. a Mikrobiol. (SZÚ, PRAHA)* 20, 27–32.
- Fabiánová, K., Beneš, Č., Šebestová, H., Kynčl, J., Částková, J., Zavadilová, J., Lžičarová, D., and Kříž, B. (2013). Pertuse v ČR v roce 2012 – rozbor epidemiologické situace. *Zprávy Cent. Epidemiol. a Mikrobiol. (SZÚ, PRAHA)* 22, 55–61.
- Feunou, P.F., Ismaili, J., Debrie, A.-S., Huot, L., Hot, D., Raze, D., Lemoine, Y., and Loch, C. (2008). Genetic stability of the live attenuated Bordetella pertussis vaccine candidate BPZE1. *Vaccine* 26, 5722–5727.
- Feunou, P.F., Kammoun, H., Debrie, A.-S., Mielcarek, N., and Loch, C. (2010). Long-term immunity against pertussis induced by a single nasal administration of live attenuated B. pertussis BPZE1. *Vaccine* 28, 7047–7053.
- Garlapati, S., Eng, N.F., Kiros, T.G., Kindrachuk, J., Mutwiri, G.K., Hancock, R.E.W., Halperin, S. a, Potter, A. a, Babiuk, L. a, and Gerds, V. (2011). Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis. *Vaccine* 29, 6540–6548.
- Van Gent, M., van Loo, I.H.M., Heuvelman, K.J., de Neeling, A.J., Teunis, P., and Mooi, F.R. (2011). Studies on Prn variation in the mouse model and comparison with epidemiological data. *PLoS One* 6, e18014.
- Geuijen, C. a, Willems, R.J., Hoogerhout, P., Puijk, W.C., Meloen, R.H., and Mooi, F.R. (1998). Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of Bordetella pertussis. *Infect. Immun.* 66, 2256–2263.

Geurtsen, J., Steeghs, L., Hamstra, H.-J., Ten Hove, J., de Haan, A., Kuipers, B., Tommassen, J., and van der Ley, P. (2006). Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 74, 5574–5585.

Goldman, W.E., Klapper, D.G., and Baseman, J.B. (1982). Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect. Immun.* 36, 782–794.

De Gouw, D., Hermans, P.W.M., Bootsma, H.J., Zomer, A., Heuvelman, K., Diavatopoulos, D. a, and Mooi, F.R. (2014). Differentially expressed genes in *Bordetella pertussis* strains belonging to a lineage which recently spread globally. *PLoS One* 9, e84523.

Gracia, A., Polewicz, M., Halperin, S. a, Hancock, R.E.W., Potter, A. a, Babiuk, L. a, and Gerdts, V. (2011). Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel *Bordetella pertussis* vaccine formulations. *Vaccine* 29, 1595–1604.

Greco, D., Salmaso, S., Mastrantonio, P., Giuliano, M., Tozzi, A.E., Anemona, A., Atti, M.L.C.D., Giammanco, A., Panei, P., Blackwelder, W.C., et al. (1996). A Controlled Trial of Two Acellular Vaccines and One Whole-cell Vaccine Against Pertussis. *N. Engl. J. Med.* 334, 341–348.

*Guiso, N. (2014). *Bordetella pertussis*: why is it still circulating? *J. Infect.* 68 *Suppl* 1, S119–24.

Guiso, N., & Bodilis, H. (2013). Virulence of Negative *Bordetella pertussis* Isolates from Infants ., *Emerg. Infect. Dis.* 19, 471–474.

*Gupta, R.K., Saxena, S.N., Sharma, S.B., and Ahuja, S. (1990). Hemagglutination activities of purified pertussis toxin and filamentous hemagglutinin against erythrocytes from various animals. *Microbiol. Immunol.* 34, 795–799.

Gustafsson, L., Hallander, H.O., Olin, P., Reizenstein, E., and Storsaeter, J. (1996). A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* 334, 349–355.

Haberling, D.L., Holman, R.C., Paddock, C.D., and Murphy, T. V (2009). Infant and maternal risk factors for pertussis-related infant mortality in the United States, 1999 to 2004. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28, 194–198.

Halperin, S. a, Bortolussi, R., Langley, J.M., Miller, B., and Eastwood, B.J. (1997). Seven days of erythromycin estolate is as effective as fourteen days for the treatment of *Bordetella pertussis* infections. *Pediatrics* 100, 65–71.

Healy, C.M., Munoz, F.M., Rench, M. a, Halasa, N.B., Edwards, K.M., and Baker, C.J. (2004). Prevalence of pertussis antibodies in maternal delivery, cord, and infant serum. *J. Infect. Dis.* 190, 335–340.

Healy, C.M., Rench, M. a, Edwards, K.M., and Baker, C.J. (2006). Pertussis serostatus among neonates born to Hispanic women. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1439–1442.

Hegerle, N., Paris, a-S., Brun, D., Dore, G., Njamkepo, E., Guillot, S., and Guiso, N. (2012). Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetellae* not expressing pertactin. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, E340–6.

Heininger, U., Cherry, J.D., Stehr, K., Schmitt-Grohé, S., Überall, M., Laussucq, S., Eckhardt, T., Meyer, M., Gornbein, J., and the Pertussis Vaccine Study Group (1998). Comparative Efficacy of the Lederle/Takeda Acellular Pertussis Component DTP (DTaP) Vaccine and Lederle Whole-Cell Component DTP Vaccine in German Children After Household Exposure. *Pediatrics* 102, 546–553.

Heiss, L.N., Moser, S. a, Unanue, E.R., and Goldman, W.E. (1993). Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect. Immun.* 61, 3123–3128.

*Hewlett, E.L., Burns, D.L., Cotter, P. a, Harvill, E.T., Merkel, T.J., Quinn, C.P., and Stibitz, E.S. (2014). Pertussis pathogenesis--what we know and what we don't know. *J. Infect. Dis.* 209, 982–985.

Higgs, R., Higgins, S.C., Ross, P.J., and Mills, K.H.G. (2012). Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* 5, 485–500.

Cheung, G.Y.C., Xing, D., Prior, S., Corbel, M.J., Parton, R., and Coote, J.G. (2006). Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infect. Immun.* 74, 6797–6805.

Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F., and Cotter, P. a (2010). Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect. Immun.* 78, 2901–2909.

Ishibashi, B.Y., Claus, S., and Relman, D.A. (1994). *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin Interacts with a Leukocyte Signal Transduction Complex and Stimulates Bacterial Adherence to Monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* 180, 1225 –1233.

Izurieta, H.S., Kenyon, T. a, Strebel, P.M., Baughman, a L., Shulman, S.T., and Wharton, M. (1996). Risk factors for pertussis in young infants during an outbreak in Chicago in 1993. *Clin. Infect. Dis.* 22, 503–507.

Jacobs, C., Huang, L.J., Bartowsky, E., Normark, S., and Park, J.T. (1994). Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J.* 13, 4684–4694.

- Kallonen, T., and Mertsola, J. (2012). Rapid detection of the recently emerged *Bordetella pertussis* strains with the ptxP3 pertussis toxin promoter allele by real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* *18*, E377–E379.
- Katada, T. A., Tamura, M.B., Ui, M. (1983). The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys* *224*, 290-298.
- Khelef, N., Zychlinsky, a, and Guiso, N. (1993). *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* *61*, 4064–4071.
- Klein, N.P., Bartlett, J., Rowhani-Rahbar, A., Fireman, B., and Baxter, R. (2012). Waning protection after fifth dose of acellular pertussis vaccine in children. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1012–1019.
- Lam, C., Octavia, S., Bahrame, Z., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., and Lan, R. (2012). Selection and emergence of pertussis toxin promoter ptxP3 allele in the evolution of *Bordetella pertussis*. *Infect. Genet. Evol.* *12*, 492–495.
- Lam, C., Octavia, S., and Ricafort, L. (2014). Rapid Increase in Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* Isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* *20*, 626–633.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P., and Brennan, M.J. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 345–349.
- Locht, C., and Mielcarek, N. (2012). New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *66*, 121–133.
- Macdonald-Fyall, J., Xing, D., Corbel, M., Baillie, S., Parton, R., and Coote, J. (2004). Adjuvanticity of native and detoxified adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* towards co-administered antigens. *Vaccine* *22*, 4270–4281.
- Marr, N., Oliver, D.C., Laurent, V., Poolman, J., Denoël, P., and Fernandez, R.C. (2008). Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine* *26*, 4306–4311.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y., and Horiguchi, Y. (2000). Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *EMBO J.* *19*, 521–530.
- *Mattoo, S., & Cherry, J.D. (2005). Molecular Pathogenesis , Epidemiology , and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 326–382.
- McCluskie, M.J., and Davis, H.L. (1999). CpG DNA as mucosal adjuvant. *Vaccine* *18*, 231–237.

- Melvin, J. a, Scheller, E. V, Miller, J.F., and Cotter, P. a (2014). *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 274–288.
- Mielcarek, N., Debie, A., Raze, D., Bertout, J., Rouanet, C., Younes, A. Ben, Creusy, C., Engle, J., Goldman, W.E., and Loch, C. (2006). Live Attenuated *B. pertussis* as a Single-Dose Nasal Vaccine against Whooping Cough. *PLoS One* 2, 0662–0670.
- Mills, K.H.G., & Gerdt, V. (2014). Mouse and Pig Models for Studies of Natural and Vaccine-Induced Immunity to *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* 209 Suppl, S16–9.
- Mills, K.H.G., Ross, P.J., Allen, A.C., and Wilk, M.M. (2014). Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis? *Trends Microbiol.* 22, 49–52.
- Misegades, L.K., Winter, K., Harriman, K., Talarico, J., Messonnier, N.E., Clark, T. a, and Martin, S.W. (2012). Association of childhood pertussis with receipt of 5 doses of pertussis vaccine by time since last vaccine dose, California, 2010. *JAMA* 308, 2126–2132.
- Mooi, F.R., van Loo, I.H.M., van Gent, M., He, Q., Bart, M.J., Heuvelman, K.J., de Greeff, S.C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., et al. (2009). *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1206–1213.
- Morse, S.I., & Morse, J.H. (1976). Isolation and Properties of the Leukocytosis- and Lymphocytosis-promoting Factor of *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 143, 1483–1502.
- Octavia, S., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Lawrence, A., Keil, A.D., Hogg, G., and Lan, R. (2012). Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008-2010. *J. Infect. Dis.* 205, 1220–1224.
- Paddock, C.D., Sanden, G.N., Cherry, J.D., Gal, A. a, Langston, C., Tatti, K.M., Wu, K.-H., Goldsmith, C.S., Greer, P.W., Montague, J.L., et al. (2008). Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin. Infect. Dis.* 47, 328–338.
- Pishko, E., & Betting, D. (2003). *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. *Infect. Immun.* 71, 4936–4942.
- Polewicz, M., Gracia, A., Buchanan, R., Strom, S., Halperin, S. a, Potter, A. a, Babiuk, L. a, and Gerdt, V. (2011). Influence of maternal antibodies on active pertussis toxoid immunization of neonatal mice and piglets. *Vaccine* 29, 7718–7726.
- Polewicz, M., Gracia, A., Garlapati, S., van Kessel, J., Strom, S., Halperin, S. a, Hancock, R.E.W., Potter, A. a, Babiuk, L. a, and Gerdt, V. (2013). Novel vaccine formulations against pertussis offer earlier onset of immunity and provide protection in the presence of maternal antibodies. *Vaccine* 31, 3148–3155.

Prasad, S.M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (1993). Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* *61*, 2780–2785.

Preston, A., Allen, A.G., Cadisch, J., Stevens, K., Churcher, C.M., Badcock, K.L., Parkhill, J., Barrell, B., Maskell, D.J., Thomas, R., et al. (1999). Genetic Basis for Lipopolysaccharide O-Antigen Biosynthesis in *Bordetellae*. *Infect. Immun.* *67*, 3763–3767.

Procházka J, Kryl R. (1959). Problematika pertuse. *Praktický lékař*, 20. března, 6, s. 241–246.

Public Health Agency of Canada (PHAC 2003). National Consensus: Conference on pertussis. Canada Communicable Disease Report 29S3. Dostupné z: <http://resources.cpha.ca/immunize.ca/data/105e.pdf>

Queenan, A.M., Cassiday, P.K., and Evangelista, A. (2013). Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in the United States. *N. Engl. J. Med.* *368*, 583–584.

Quinlan, T., Musser, K.A., Currenti, S.A., Zansky, S.M., and Halse, T.A. (2013). Pertactin-negative variants of *Bordetella pertussis* in New York State : A retrospective analysis , 2004-2013. *Mol. Cell. Probes* 58–60.

Redhead, K., Watkins, J., Barnard, a, and Mills, K.H. (1993). Effective immunization against *Bordetella pertussis* respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* *61*, 3190–3198.

Roberts, R., Moreno, G., Bottero, D., Gaillard, M.E., Fingerhann, M., Graieb, A., Rumbo, M., and Hozbor, D. (2008). Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine* *26*, 4639–4646.

Ross, P.J., Sutton, C.E., Higgins, S., Allen, A.C., Walsh, K., Misiak, A., Lavelle, E.C., McLoughlin, R.M., and Mills, K.H.G. (2013). Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to *Bordetella pertussis*: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog.* *9*, e1003264.

Sakamotos, H., Bellalou, J., Sebo, P., and Ladant, D. (1992). *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin: Structural and Functional Independence of the Catalytic and Hemolytic Activities. *J. Biol. Chem.* *348*, 13598–13602.

Van Savage, J., Decker, M.D., Edwards, K.M., Sell, S.H., and Karzon, D.T. (1990). Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response. *J. Infect. Dis.* *161*, 487–492.

Schmidtke, A.J., Boney, K.O., Martin, S.W., Skoff, T.H., Tondella, M.L., and Tatti, K.M. (2012). Population Diversity among *Bordetella pertussis* Isolates . *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 1991–1996.

- Skerry, C.M., and Mahon, B.P. (2011). A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.* *18*, 187–193.
- Smits, K., Pottier, G., Smet, J., and Dirix, V. (2013). Different T cell memory in preadolescents after whole-cell or acellular pertussis vaccination. *Vaccine* *32*, 111–118.
- Státní zdravotní ústav (2014a). Infekce v ČR 2014, kumulativně [online]. [2014] [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/kumulativni-nemocnost-vybranych-hlasenych-infekci-v-ceske>
- Státní zdravotnický ústav (2014b). Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2004-2013 - absolutně [online]. [2014] [cit. 2014-05-1]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>
- Thorstensson, R., Trollfors, B., Al-Tawil, N., Jahnmatz, M., Bergström, J., Ljungman, M., Törner, A., Wehlin, L., Van Broekhoven, A., Bosman, F., et al. (2014). A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One* *9*, e83449.
- Vyhláška MZČR č. 65/2009 Sb., kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem. Sbírka zákonů 2009, částka 21 (2009).
- Vyhláška MZČR č. 473/2008 Sb. o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce. Sbírka zákonů 2008, částka 158 (2008).
- Vyhláška MZČR č. 537/2006 Sb. o očkování proti infekčním nemocem. Sbírka zákonů 2006, částka 174 (2006).
- Walker, a M., Jick, H., Perera, D.R., Knauss, T. a, and Thompson, R.S. (1988). Neurologic events following diphtheria-tetanus-pertussis immunization. *Pediatrics* *81*, 345–349.
- Warfel, J.M., Beren, J., and Merkel, T.J. (2012a). Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* *206*, 902–906.
- Warfel, J.M., Beren, J., Kelly, V.K., Lee, G., and Merkel, T.J. (2012b). Nonhuman primate model of pertussis. *Infect. Immun.* *80*, 1530–1536.
- Warfel, J.M., Zimmerman, L.I., and Merkel, T.J. (2014). Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 787–792.
- Watanabe, M., Takimoto, H., Kumazawa, Y., and Amano, K. (1990). Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J. Gen. Microbiol.* *136*, 489–493.

- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., and Falkow, S. (1983). Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 42, 33–41.
- Wendelboe, A.M., Njamkepo, E., Bourillon, A., Floret, D.D., Gaudelus, J., Gerber, M., Grimprel, E., Greenberg, D., Halperin, S., Liese, J., et al. (2007). Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 26, 293–299.
- Willems, R.J.L., Kamerbeek, J., Geuijen, C.A.W., Top, J., Gielen, H., Gaastra, W., and Mooi, F.R. (1998). The efficacy of a whole cell pertussis vaccine and fimbriae against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infections in respiratory mouse model. *Vaccine* 16, 1255.
- Willems RJ, van der Heide HG, Mooi FR (1992). Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol. Sep*;6(18):2661-71.
- Winter, K., Harriman, K., Zipprich, J., Schechter, R., Talarico, J., Watt, J., and Chavez, G. (2012). California pertussis epidemic, 2010. *J. Pediatr.* 161, 1091–1096.
- Wirsing von König, C.H., Postels-Multani, S., Bogaerts, H., Bock, H.L., Laukamp, S., Kiederle, S., and Schmitt, H.J. (1998). Factors influencing the spread of pertussis in households. *Eur. J. Pediatr.* 157, 391–394.
- Witt, M. a, Arias, L., Katz, P.H., Truong, E.T., and Witt, D.J. (2013). Reduced risk of pertussis among persons ever vaccinated with whole cell pertussis vaccine compared to recipients of acellular pertussis vaccines in a large US cohort. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1248–1254.
- Witt, M.A., Katz, P.H., and Witt, D.J. (2012). Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 54, 1730–1735.
- World Health Organization (2013a). Pertussis reported cases [online]. © 2013 [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tsincidencepertussis.html
- World Health Organization (2013b). Third dose of diphtheria toxoid, tetanus toxoid and pertussis vaccine [online]. © 2013 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/timeseries/tscovergedtp3.html
- Zavdilová, J., Fabiánová, K., and Maixnerová, M. (2009). Doporučení pro laboratorní diagnostiku dávivého kašle. *Zprávy Epidemiol. a Mikrobiol. (SZÚ, Praha)* 18, 24–25.

Zhang, X., Goebel, E.M., Rodríguez, M.E., Preston, A., and Harvill, E.T. (2009). The O antigen is a critical antigen for the development of a protective immune response to *Bordetella parapertussis*. *Infect. Immun.* 77, 5050–5058.

Zorzeto, T.Q., Higashi, H.G., da Silva, M.T.N., Carniel, E.D.F., Dias, W.O., Ramalho, V.D., Mazzola, T.N., Lima, S.C.B.S., Morcillo, A.M., Stephano, M.A., et al. (2009). Immunogenicity of a whole-cell pertussis vaccine with low lipopolysaccharide content in infants. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 544–550.

(sekundární citace označeny *)